

様式 C-19

科学研究費助成事業（科学研究費補助金）研究成果報告書

平成 24 年 5 月 21 日現在

機関番号：15201
研究種目：基盤研究（C）
研究期間：2009～2011
課題番号：21500325
研究課題名（和文） 視床下部レプチン・メラノコルチン系摂食回路への内臓感覚入力を実験形態学的に視る
研究課題名（英文） Morphological analysis of the visceral sensory pathways to the leptin-melanocortin system in the feeding-related neural circuits of the hypothalamus
研究代表者
安井 幸彦（YASUI YUKIHIKO）
島根大学・医学部・教授
研究者番号：30174501

研究成果の概要（和文）：

内臓感覚による摂食行動の修飾機構を明らかにする目的で、摂食行動の調節に関与する視床下部レプチン・メラノコルチン系ニューロンへの内臓感覚入力系について形態学的に解析し、以下のような結果を得た。（1）視床下部のオレキシン産生ニューロンは内臓感覚中継核である外側結合腕傍核のグルタミン酸作動性ニューロンによって興奮性の影響を受ける。（2）嗅覚や内臓感覚の情報処理に関わる扁桃体皮質核と基底内側核は視床下部のメラニン凝集ホルモン産生ニューロンに対してグルタミン酸作動性で興奮性の投射をする。

研究成果の概要（英文）：

We examined the visceral sensory pathways to the leptin-melanocortin system in the rat hypothalamus. The results of the present study are as follows: (1) orexin neurons are under the excitatory influence of the glutamatergic neurons of the lateral parabrachial nucleus which is the relay site of visceral sensory information; (2) melanin-concentrating hormone neurons are under the excitatory influence of the glutamatergic neurons of the cortical and basomedial nuclei which are involved in processing olfactory and visceral information.

交付決定額

（金額単位：円）

	直接経費	間接経費	合計
2009年度	1,900,000	570,000	2,470,000
2010年度	800,000	240,000	1,040,000
2011年度	800,000	240,000	1,040,000
総計	3,500,000	1,050,000	4,550,000

研究分野：総合領域

科研費の分科・細目：神経科学・神経解剖学/神経病理学

キーワード：視床下部、結合腕傍核、扁桃体、オレキシン、メラニン凝集ホルモン
神経回路、摂食行動

1. 研究開始当初の背景

申請者は情動に伴う摂食行動の変化において扁桃体がどのように作用しているかを追及する目的で、扁桃体中心核からの出力線維と視床下部の摂食関連ニューロンとの連絡様式を分析してきた。その過程で、味の違いや空腹感・満腹感によって摂食量が左右されることをよく経験しているにもかかわらず、その神経機構についてはほとんど分かっていないことに気付いた。そこで本研究では、視床下部レプチン・メラノコルチン系摂食回路を構成するニューロンへの内臓感覚入力を形態学的に探索することを計画した。

特殊内臓感覚である味覚や一般内臓感覚は、脳神経によって孤束核に伝達され、孤束核から結合腕傍核を介して視床下部に伝えられる。また、もう一つの特特殊内臓感覚である嗅覚は嗅球から扁桃体を経て視床下部に伝えられる。一方、摂食行動が視床下部によって調節されていることは以前から知られており、最近の分子生物学の発展により、視床下部レプチン・メラノコルチン系神経回路が摂食行動の制御に重要な働きをしていることが明らかとなってきた。すなわち、視床下部弓状核にメラノコルチンの一つである α -メラノサイト刺激ホルモンを産生するニューロンやアグーチ関連蛋白を産生するニューロンが存在し、これらレプチンの支配下にあるニューロンが視床下部外側野に存在するメラノコルチン4受容体 (MC4-R) 発現ニューロンに作用することによって、それぞれ摂食行動を抑制し、促進すると考えられている。さらに、視床下部外側野には摂食を促進するメラニン凝集ホルモン (MCH) 産生ニューロンやオレキシン (ORX) 産生ニューロンが多数分布しており、これらのニューロンは MC4-R を有することなく、レプチンによって直接抑制されると言われている。

2. 研究の目的

上述したレプチン・メラノコルチン系摂食回路構成ニューロンのうち、外側視床下部に存在して摂食を促進すると考えられている

MCH 産生ニューロンや ORX 産生ニューロンへの内臓感覚入力存在様式を、光顕的および電顕的に詳細な分析を行うことによって、内臓感覚による摂食行動の修飾機構を明らかにすることを目的とした。

3. 研究の方法

(1) 外側結合腕傍核からの出力線維と、ORX 産生ニューロンの分布様態ならびに接合様態を、視床下部にて光顕的および電顕的に解析するとともに、視床下部に投射する外側結合腕傍核ニューロンの伝達物質を同定した。

① 外側結合腕傍核線維と ORX 産生ニューロンとの接合様態の解析

1) ラットの外側結合腕傍核にビオチン化デキストラランアミン (BDA) を電気泳動的に微量注入し、その1週間後に灌流固定した。

2) フリージングマイクロトームにて前頭断脳切片を作成し、BDA 標識終末をアビジン-ビオチン複合体で検出後、抗 ORX 抗体を用いて ORX 陽性ニューロンを検出した。なお、この場合クロモゲンとして、BDA 標識終末の検出にはジアミノベンチジン (DAB) にニッケルアンモニウムを加え、ORX 陽性ニューロンの検出には DAB のみを用いた。

3) 光顕下で、BDA 標識終末と ORX 陽性ニューロンの分布様態や接合様態を、視床下部にて詳細に解析した。

4) 電顕観察の場合には、上記の2)と同様に灌流固定して取り出した脳を、ビブラトームを用いて厚さ30 μ mの前頭断切片とし、上記の4)と同様に反応して、BDA 標識終末と ORX 陽性ニューロンを検出した。なお、この場合にはそれぞれの標識産物を電顕下で区別できるように、BDA の検出には DAB に銀増感処理を施し、ORX 陽性ニューロンの検出には DAB のみを用いた。

5) 視床下部において、BDA 標識終末と ORX 陽性ニューロンの分布が一致する領域を検索し、その領域を含む切片をエポキシに包埋して電顕用試料とした。

6) 電顕下にて、BDA 標識終末と ORX 陽性ニューロンとのシナプス構築を観察し、その画

像を解析した。

② 視床下部に投射する外側結合腕傍核ニューロンの伝達物質の同定

1) コレラトキシンBサブユニット (CTb) を脳弓の背内側部に注入し、その1週間後に灌流固定した。

2) フリージングマイクロトームで、厚さ50 μmの前頭断脳切片を作成し、*in situ* ハイブリダイゼーションによって、小胞性グルタミン酸トランスポーター2 (VGLUT2) mRNA を検出し、ジゴキシングニン (DIG) で標識した。さらに、DIG は免疫組織化学的に Cy3 で蛍光標識した。

3) CTb 標識ニューロンを免疫組織化学的に検出し、Alexa488 で蛍光標識した。

4) 共焦点レーザー顕微鏡を用いて、結合腕傍核を観察し、CTb 標識ニューロンと DIG 標識ニューロンの異同を検索した。

(2) 嗅覚や内臓感覚の情報処理に働くことがよく知られている扁桃体皮質核と基底内側核から視床下部の MCH 含有ニューロンへ入力について、光顕的および電顕的に解析した。

① 扁桃体皮質核線維および基底内側核線維と MCH 産生ニューロンとの接合様態の解析

1) ラットの扁桃体皮質核に BDA を注入し、その1週間後に灌流固定した。

2) 上記の ①-2) と同様の方法で、BDA 標識終末と MCH 陽性ニューロンを検出した。

3) 光顕下で、BDA 標識終末と MCH 陽性ニューロンの分布様態や接合様態を、視床下部にて詳細に解析した。

4) 視床下部において、BDA 標識終末と MCH 陽性ニューロンの分布が一致する領域を検索し、その領域を含む切片をエポキシに包埋して電顕用試料とした。

5) 電顕下にて、BDA 標識終末と MCH 陽性ニューロンとのシナプス構築を観察し、その画像を解析した。

6) 上記の各実験を扁桃体基底内側核についても行った。

② 視床下部に投射する扁桃体皮質核および基底内側核ニューロンの伝達物質の同定

1) 外側結合腕傍核線維と ORX 陽性ニューロンの分布一致領域である脳弓の背内側部に

CTb を注入し、その1週間後に灌流固定した。

2) 上記 (1) - ② と同様の方法で、視床下部に投射する扁桃体皮質核および基底内側核ニューロンが VGLUT2 mRNA 陽性であるかどうかを検索した。

4. 研究成果

(1) 外側結合腕傍核から視床下部 ORX 産生ニューロンへの投射様式について、以下のような結果を得た。

1) BDA で標識された外側結合腕傍核からの投射線維終末野と ORX 陽性ニューロンの分布域が脳弓の背内側部で強く重なった。

2) この分布一致領域内で、外側結合腕傍核からの線維終末が ORX 陽性ニューロンの細胞体や樹状突起と非対称性のシナプスを形成してした。

3) CTb による逆行性標識法と VGLUT2 mRNA に対する *in situ* hybridization を併用して、視床下部に投射する外側結合腕傍核ニューロンのほとんどが VGLUT2 mRNA 陽性であることを判明した。

以上より、視床下部の ORX 産生ニューロンは、グルタミン酸を伝達物質とする外側結合腕傍核ニューロンによって、興奮性の影響を受けることが示唆された。

(2) 嗅覚および内臓感覚の情報処理に関わっている扁桃体皮質核と基底内側核から視床下部の MCH 含有ニューロンへ入力について、以下のような結果を得た。

1) 皮質核と基底内側核からの投射線維と MCH 陽性ニューロンの分布一致を外側視床下部の腹外側部で、内包のすぐ内側方に認めた。

2) これらの投射線維と MCH 陽性ニューロンとの間に、非対称性シナプスの形成を見た、

3) これらの投射線維を出すニューロンのほとんどは VGLUT2 mRNA 陽性であった。

以上のことから、扁桃体皮質核と基底内側核のニューロンは外側視床下部の MCH 産生ニューロンに対してグルタミン酸作動性で興奮性の投射をすることによって、摂食行動の調節に働いていることが示唆された。

5. 主な発表論文等

(研究代表者及び研究分担者には下線)
〔雑誌論文〕(計 10 件)

(1) S. Yokota, J.-G. Niu, T. Tsumori, T. Oka, Y. Yasui

Glutamatergic Kölliker-Fuse nucleus neurons innervate hypoglossal motoneurons whose axons form the medial (protruder) branch of the hypoglossal nerve in the rat. Brain Research 1404: 10-20, 2011

査読有

(2) R. Aoyama, Y. Okada, S. Yokota, K. Fukuda, Y. Shinozaki, H. Yoshida, M. Nakamura, K. Chiba, Y. Yasui, F. Kato, Y. Toyama

Spatiotemporal and anatomical analyses of P2X receptor-mediated neuronal and glial processing of sensory signals in the rat dorsal horn. Pain 152: 2085-2097, 2011

査読有

(3) 安井幸彦

情動運動系の出力路 -a morphological review- 分子精神医学 第 11 巻第 1 号、pp. 14-22、2011

(4) J.-G. Niu, S. Yokota, T. Tsumori, Y. Qin, Y. Yasui

Glutamatergic lateral parabrachial neurons innervate orexin-containing hypothalamic neurons in the rat. Brain Research 1358: 110-122, 2010 査読有

(5) T. Tsumori, Y. Qin, S. Yokota, J.-G. Niu, Y. Yasui

Central amygdaloid axon terminals are in contact with retrorubral field neurons that project to the parvicellular reticular formation of the medulla oblongata in the rat.

Brain Research, 1306: 18-28, 2010 査読有

(6) Y. Okada, S. Yokota, Y. Shinozaki, F. Miwakeichi, Y. Oku, Y. Yasui.

Anatomical changes of phrenic motoneurons during development.

Advances in Experimental Medicine and Biology 669:33-36, 2010, 査読有

(7) S. Yokota, Y. Shinozaki, Y. Oku, Y. Okada, Y. Yasui.

Vesicular glutamate transporter 2-immunoreactive synapses onto phrenic motoneurons in the neonatal rat.

Advances in Experimental Medicine and Biology 669:189-192, 2010, 査読有

(8) 安井幸彦

視床下部外側野における摂食調節機構

島根医学 第 29 巻第 4 号、pp. 1-7, 2009

(9) Okada Y., S. Yokota, Y. Shinozaki, R. Aoyama, Y. Yasui, Ishiguro M., Oku Y. Anatomical architecture and responses to acidosis of a novel respiratory neuron group in the high cervical spinal cord (HCRG) of the neonatal rat.

Advances in Experimental Medicine and Biology 648, 387-394, 2009, 査読有

(10) S. Nakamura, T. Tsumori, S. Yokota, T. Oka, Y. Yasui

Amygdaloid axons innervate melanin-concentrating hormone- and orexin-containing neurons in the mouse lateral hypothalamus.

Brain Research 1278, 66-74, 2009, 査読有

〔学会発表〕(計 22 件)

(1) 安井幸彦

皮質下辺縁系から三叉神経運動核への投射 (シンポジウム)

第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, (甲府)山梨大学, 2012 年 3 月 27 日

(2) 牛 建国、横田茂文、津森登志子、岡 達郎、安井幸彦

Projections from the amygdaloid anterior basomedial and anterior cortical nuclei to MCH-containing hypothalamic neurons of the rat. 第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会, 山梨大学(甲府), 2012 年 3 月 27 日

(3) 津森登志子、岡 達郎、牛 建国、安井幸彦

Nodose ganglion cells expressing melanocortin-4 receptor send their fibers to the pancreatic islets in the mouse
第 117 回日本解剖学会総会・全国学術集会、山梨大学（甲府）、2012 年 3 月 27 日

(4) 津森登志子、安井幸彦

The melanocortin system in energy homeostasis-Relationship between melanocortin-4 receptor and vagus nerve -

島根大学・寧夏医科大学国際シンポジウム、島根大学（出雲）、2012 年 3 月 8 日

(5) 津森登志子、岡 達郎、牛 建国、安井幸彦

迷走神経背側運動核および節状神経節におけるメラノコルチン 4 受容体発現ニューロンは膵臓へ線維を送る - 遺伝子導入マウスにおける解析 -

日本解剖学会第 66 回中国・四国支部学術集会、徳島大学（徳島）、2011 年 11 月 13 日

(6) 牛 建国、横田茂文、津森登志子、岡 達郎、安井幸彦

ラット扁桃体基底内側核前部および皮質核前部から外側視床下部メラニン凝集ホルモン含有ニューロンへの投射

第 34 回日本神経科学大会年、パシフィコ横浜（横浜）、2011、9 月 15 日

(7) 津森登志子、岡 達郎、牛 建国、安井幸彦

メラノコルチン 4 受容体を発現する迷走神経背側運動核ニューロンとマウス壁内神経節ニューロンとのシナプス構築

第 34 回日本神経科学学会年次集会 2011、パシフィコ横浜（横浜）、9 月 15 日

(8) 岡 達郎、横田茂文、津森登志子、牛 建国、安井幸彦

中心灰白質外側部のグルタミン酸作動性ニューロンは延髄腹外側部のニューロキニン 1 受容体発現ニューロンを支配する

第 34 回日本神経科学学会年次集会 2011、パシフィコ横浜（横浜）、9 月 17 日

(9) 津森登志子、岡 達郎、横田茂文、安井幸彦

マウス壁内神経節および膵内神経節はメラノコルチン 4 受容体を発現する迷走神経背側運動核ニューロンから入力線維を受ける
第 116 回解剖学会全国学術集会、横浜、2011 年 3 月 28-30 日（震災のため中止：誌上開催）

(10) 岡 達郎、横田茂文、津森登志子、牛 建国、安井幸彦

ラット中心灰白質外側部のグルタミン酸作動性ニューロンは延髄腹外側部の neurokinin-1 受容体発現ニューロンへ投射する
第 116 回解剖学会全国学術集会、横浜、2011 年 3 月 28-30 日（震災のため中止：誌上開催）

(11) S. Yokota, J.-G. Niu, T. Tsumori, T. Oka, Y. Yasui

Glutamatergic neurons in the Kölliker-Fuse nucleus are in contact with hypoglossal motoneurons supplying the medial branch of the hypoglossal nerve in the rat
The 40th Annual meeting of Neuroscience, San Diego, November 16, 2010

(12) 岡 達郎、横田茂文、津森登志子、牛 建国、安井幸彦

ラット中心灰白質外側部から延髄腹外側部の neurokinin-1 受容体発現ニューロンへ至るグルタミン酸作動性投射

日本解剖学会第 65 回中国・四国支部学術集会、広島国際大学（呉）、2010 年 10 月 10 日

(13) 津森登志子、岡 達郎、横田茂文、安井幸彦

マウス壁内神経節はメラノコルチン 4 受容体を発現する迷走神経背側運動核ニューロンから入力線維を受ける

第 33 回日本神経科学大会・第 53 回日本神経化学学会大会・第 20 回日本神経回路学会大会、神戸コンベンションセンター（神戸）、2010 年 9 月 2 日

(14) 牛 建国、横田茂文、津森登志子、岡 達郎、安井幸彦

メラニン凝集ホルモン含有外側視床下部ニューロンは扁桃体基底内側核前部から投射線維をうける：ラットにおける神経解剖学的

および神経化学的研究

第33回日本神経科学大会・第53回日本神経化学会大会・第20回日本神経回路学会大会、神戸コンベンションセンター（神戸）、2010年9月4日

(15) 津森登志子、岡 達郎、横田茂文、安井幸彦

膝内神経節はメラノコルチン4受容体を発現する迷走神経背側運動核ニューロンから入力線維を受ける

第115回解剖学会全国学術集会、岩手県民会館（盛岡）、2010年3月28日

(16) 牛 建国、横田茂文、津森登志子、安井幸彦

ラットのメラニン凝集ホルモン含有外側視床下部ニューロンは扁桃体の基底内側核前部から投射線維を受ける

第115回解剖学会全国学術集会 2010年3月29日、岩手県民会館（盛岡）

(17) 岡 達郎、横田茂文、津森登志子、安井幸彦

ラット中心灰白質腹内側部から延髄腹外側部へ至るグルタミン酸作動性神経路

第115回解剖学会全国学術集会、岩手県民会館（盛岡）、2010年3月29日

(18) 横田茂文、津森登志子、岡 達郎、牛 建国、安井幸彦

ラットKolliker-Fuse核は舌下神経核へグルタミン酸作動性投射をする

日本解剖学会第64回中国・四国支部学術集会、高知大学（南国市）、2009年10月25日

(19) 津森登志子、横田茂文、岡 達郎、安井幸彦

Innervation of intrapancreatic ganglia by melanocortin 4 receptor-expressing parasympathetic preganglionic neurons

第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場（名古屋）、2009年9月18日

(20) 横田茂文、津森登志子、岡 達郎、牛 建国、安井幸彦

Glutamatergic projection from the Kolliker-Fuse nucleus to the hypoglossal nucleus in the rat

第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場（名古屋）、2009年9月18日

(21) 岡 達郎、横田茂文、津森登志子、安井幸彦

Glutamatergic projection from the ventromedial part of the periaqueductal gray to the contralateral ventrolateral medulla in the rat

第32回日本神経科学大会、名古屋国際会議場（名古屋）、2009年9月18日

(22) S. Yokota, Y. Shinozaki, Y. a Oku, Y. Okada, Y. Yasui Anatomical and Functional Correlates between Phrenic and Scalene Motoneurons

in the Cervical Spinal Cord of Neonatal Rats The XI th Oxford Conference on modeling and control of Breathing, Nara, 2009, July 24

[図書] (計2件)

(1) 安井幸彦

骨格(骨学総論、骨学各論). 野村 巖編: 標準理学療法学・作業療法学〔専門基礎分野〕解剖学 第3版、医学書院、東京、pp. 105-160、2010

(2) 安井幸彦

神経系(神経系総論、中枢神経系). 野村 巖編: 標準理学療法学・作業療法学〔専門基礎分野〕解剖学 第3版、医学書院、東京、pp. 309-353、2010

6. 研究組織

(1) 研究代表者

安井 幸彦 (YASUI YUKIHIKO)

島根大学・医学部・教授

研究者番号: 30174501

(2) 研究分担者

津森 登志子 (TSUMORI TOSHIKO)

島根大学・医学部・准教授

研究者番号: 30217377

横田 茂文 (YOKOTA SHIGEFUMI)

島根大学・医学部・助教

研究者番号: 50294369